

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 44 711.6
Anmeldetag: 11. September 2001
Anmelder/Inhaber: Solvay Pharmaceuticals GmbH,
Hannover/DE
Bezeichnung: Neue Gemische mikrobieller Enzyme
Priorität: 19.01.2001 DE 101 02 495.9
IPC: C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. November 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Waliner

Zusammenfassung

Es werden neue Gemische mikrobieller Enzyme beschrieben, welche eine konzentrierte Lipase von *Rhizopus delemar* und zusätzlich eine Protease von *Aspergillus melleus* sowie eine Amylase von *Aspergillus oryzae* enthalten. Weiterhin werden diese Gemische mikrobieller Enzyme enthaltende pharmazeutische Zubereitungen beschrieben. Die neuen pharmazeutischen Zubereitungen sind besonders gut geeignet zur Behandlung und/oder Prophylaxe der Maldigestion, insbesondere der auf Pankreasinsuffizienz beruhenden Maldigestion, in Säugetieren und Menschen.

Patentansprüche

1. Enzymgemisch, dadurch gekennzeichnet, daß es

- a) eine konzentrierte Lipase von *Rhizopus delemar*,
- b) eine neutrale Protease von *Aspergillus melleus* und
- c) eine Amylase von *Aspergillus oryzae*

enthält.

2. Enzymgemisch nach Anspruch 1, worin die Lipase eine spezifische Aktivität von mindestens 1.800.000 FIP-E/g aufweist.

3. Enzymgemisch nach Anspruch 1, worin die Protease eine spezifische Aktivität von mindestens 7.500 FIP-E/g aufweist.

4. Enzymgemisch nach Anspruch 1, worin die Protease ein pH-Optimum zwischen pH 6 und pH 8 aufweist.

5. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Enzymgemisch nach Anspruch 1 sowie übliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthält.

6. Zubereitung nach Anspruch 5, welche in Form von Pulver, Pellets, Microspheres, Kapseln, Sachets, Tabletten, als Suspension oder Lösung vorliegt.

7. Zubereitung nach Anspruch 5, worin mindestens eines der Enzyme, ausgewählt aus Lipase, Protease und Amylase, einzeln pelletiert vorliegt.

8. Zubereitung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, worin mindestens eines der Enzyme, ausgewählt aus Lipase, Protease und Amylase, mit einer magensaftresistenten Schicht befilmt ist.

9. Zubereitung nach Anspruch 8, worin Protease und/oder Lipase einzeln pelletiert vorliegen und mit einer magensaftresistenten Schicht befilmt sind.

10. Zubereitung nach Anspruch 5, worin das Verhältnis der Enzyme Lipase:Amylase:Protease jeweils 50-500 FIP-E:40-120 FIP-E:1 FIP-E beträgt.

11. Zubereitung nach Anspruch 5, welche pro Dosierungsseinheit mindestens 10.000 FIP-E Lipase, 8.000 FIP-E Amylase und 200 FIP-E Protease enthält.

12. Verwendung einer Zubereitung nach Anspruch 5 zur Behandlung und/oder Prophylaxe der Maldigestion in Säugetieren und Menschen.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Maldigestion durch Pankreasinsuffizienz verursacht wird.

14. Verwendung einer konzentrierten Lipase von Rhizopus delemar, welche eine spezifische Aktivität von mindestens 1.800.000 FIP-E/g aufweist, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung und/oder Prophylaxe der Maldigestion in Säugetieren und Menschen.

Solvay Pharmaceuticals GmbH
30173 Hannover

Neue Gemische mikrobieller Enzyme

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Enzymgemische, welche eine bestimmte Kombination mikrobieller Lipase, Protease und Amylase enthalten. Weiterhin betrifft die Erfindung diese Gemische mikrobieller Enzyme enthaltende pharmazeutische Zubereitungen. Diese neuen pharmazeutischen Zubereitungen sind besonders gut geeignet zur Behandlung und/oder Prophylaxe der Maldigestion bei Säugetieren und Menschen, insbesondere der auf chronischer exokriner Pankreasinsuffizienz beruhenden Maldigestion.

Maldigestion bei Säugetieren und Menschen beruht meist auf einem Mangel an Verdauungsenzymen, insbesondere auf einem Mangel an endogener Lipase, aber auch an Protease und/oder Amylase. Die Ursache für einen solchen Mangel an Verdauungsenzymen liegt häufig in einer Unterfunktion des Pankreas (= Pankreasinsuffizienz), dem Organ, welches die meisten und wichtigsten endogenen Verdauungsenzyme produziert. Sofern eine krankhafte Pankreasinsuffizienz vorliegt, kann diese angeboren oder erworben sein. Erworbene chronische Pankreasinsuffizienz kann beispielsweise auf Alkoholismus zurückzuführen sein. Angeborene Pankreasinsuffizienz kann beispielsweise auf die angeborene Erkrankung an Mukoviszidose zurückzuführen sein. Die Folgen des Mangels an Verdauungsenzymen können schwere Symptome von Unter- und Mangelernährung sein, welche einhergehen können mit einer erhöhten Anfälligkeit für Sekundärerkrankungen.

Als Therapie des Mangels an endogenen Verdauungsenzymen hat sich die Substitution mit gleichartig wirkenden exogenen Verdauungsenzymen oder Verdauungsenzymgemischen bewährt. Am

häufigsten werden heute für diesen Zweck pharmazeutische Zubereitungen (= Präparate) eingesetzt, welche Schweinepankreatin (= Pankreatin) enthalten. Solche aus den Pankreasdrüsen von Schweinen gewonnene Verdauungsenzymgemische können wegen der großen Ähnlichkeit der darin enthaltenen Enzyme und Begleitstoffe mit den im menschlichen Pankreassekret enthaltenen Inhaltsstoffen in nahezu idealer Weise für die Enzym-Substitutionstherapie am Menschen eingesetzt werden. Da einige der Bestandteile von Pankreatin - beispielsweise die Pankreaslipase und die Pankreasamylase - empfindlich gegenüber sauren pH-Werten unter pH 5 sind, sollten für die orale Verabreichung vorgesehene Pankreatinpräparate zum Schutz gegen säureinduzierte Denaturierung im Magen mit magensaftresistenten Schutzschichten überzogen sein. Solche Schutzschichten bewahren die säureempfindlichen Pankreatinbestandteile vor irreversibler Zerstörung und geben Ihren Inhalt erst nach der Magenpassage im oberen Dünndarmbereich frei, wo üblicherweise höhere, unschädliche pH-Werte - etwa zwischen pH 5,5 und pH 8 - vorherrschen. Gleichzeitig ist der obere Dünndarmbereich, beispielsweise das Duodenum der Ort, an dem in der Regel die Hauptmenge der enzymatisch gespaltenen Nahrungsbestandteile vom Körper resorbiert wird.

Da Pankreatin ein Naturprodukt ist, ist für seine Bereitstellung in qualitativ einheitlicher, hochwertiger Form ein recht erheblicher technischer Aufwand nötig. Zudem kann das Angebot an für die Verarbeitung zu Pankreatin geeigneten Rohstoffen Schwankungen unterliegen.

Es hat daher bereits verschiedentlich Versuche gegeben, für die Substitution von körpereigenen Verdauungsenzymen ähnlich gut wie Pankreatin geeignete Verdauungsenzymgemische mit dem gegenüber verbesserten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

Um für die Substitution von Verdauungsenzymen beim Menschen geeignet zu sein, müssen alle Substitutionsenzyme eine

Reihe von Anforderungen erfüllen (vgl. z. B. G. Peschke, "Active Components and Galenic Aspects of Enzyme Preparations" in: *Pancreatic Enzymes in Health and Disease*, Herausgeber: P. G. Lankisch, Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1991, Seiten 55 bis 64; im folgenden zitiert als "Peschke"). So sollten diese Substitutionsenzyme u. a. gegenüber Pepsin sowie anderen körpereigenen Proteasen wie Pankreasproteasen stabil sein. Auch in Gegenwart körpereigener Gallensalze sollten Substitutionsenzyme ihre Aktivität beibehalten.

Üblicherweise wird angenommen, daß eine Substitution der z. B. krankheitsbedingt minderproduzierten körpereigenen Lipase den wichtigsten Bestandteil einer Substitutionstherapie für Verdauungsenzyme beim Menschen darstellt. Es ist jedoch seit längerem bekannt, daß die gleichzeitige Substitution minderproduzierter Protease und Amylase einen zusätzlichen günstigen Einfluß auf die betroffenen Patienten hat (vgl. z. B. Peschke, Seite 55; WO 96/38170, Seite 6). Pharmazeutische Zubereitungen zur Behandlung und/oder Prophylaxe der Malabsorption bei Säugetieren und Menschen sollten daher neben den lipolytischen auch die proteolytischen und amylolytischen Aktivitäten des Körpers weitgehend substituieren. Wichtig ist hierbei, daß die verschiedenen in der pharmazeutischen Zubereitung enthaltenen Substitutionsenzyme (Lipase, Protease, Amylase) ihre Aktivitäten an dem dafür vorgesehenen Wirkort (das ist in der Regel der obere Dünndarmbereich) jeweils in ausreichender Höhe entfalten können. Da unter physiologischen Bedingungen bei oder kurz nach der Nahrungsaufnahme im menschlichen Magen unter anderem meist ein höherer pH-Wert, beispielsweise pH 4-5, vorliegt, als im nüchternen Magen (ca. pH 1-2) und da der physiologische pH-Wert im oberen Dünndarmbereich üblicherweise zwischen 5,5 und 8 liegt, können Verdauungsenzyme, welche über eine gute pH-Stabilität und eine gute pH-Aktivität in diesem pH-Bereich von etwa 4 bis 8 verfügen, als gut geeignet zur Substitution von Verdauungsenzymen beim Menschen angesehen werden.

Aus der europäischen Patentanmeldung EP A 0 387 945 sind bereits Zubereitungen bekannt, welche neben einem Säugetier-Pankreasextrakt zusätzlich auch eine mikrobielle Lipase enthalten. Aufgrund des darin noch enthaltenen Anteils an tierischem Pankreatin können solche Zubereitungen aber nicht durch einfach zu standardisierende Laborverfahren in stets gleichbleibender Qualität und beliebiger Menge hergestellt werden.

In der internationalen Patentanmeldung WO 96/38170 werden Zubereitungen beschrieben, welche u. a. eine säurestabile Amylase von *Aspergillus niger* und gegebenenfalls eine säurestabile Lipase von *Rhizopus javanicus* enthalten und welche als Verdauungshilfsmittel eingesetzt werden können. Für die Substitution der körpereigenen proteolytischen Aktivität werden in dieser Schrift aber keine konkreten Vorschläge gemacht. Statt dessen wird lediglich darauf verwiesen, daß die Möglichkeit besteht, alle anderen Bestandteile des menschlichen Pankreassekrets außer Lipase und Amylase durch Schweinepankreatin zu ersetzen. Dies weist darauf hin, daß die in der WO 96/38170 beschriebenen Zubereitungen nicht für die Totalsubstitution von körpereigenen Verdauungsenzymen vorgesehen oder geeignet sind.

Weiterhin werden in der Dissertation von S. Scheler, Titel: "Multiple unit-Zubereitungen aus *Aspergillus oryzae*-Enzymen hoher Aktivität mit optimierter digestiver Potenz", Universität Erlangen-Nürnberg, 1995, unter weitgehend gale-nischen Gesichtspunkten eine Kombination der kommerziell erhältlichen Enzyme Lipase von *Rhizopus oryzae*, Protease von *Aspergillus oryzae* und Amylase von *Aspergillus oryzae* untersucht. Jedoch ist beispielsweise die dort eingesetzte Lipase gegenüber körpereigener Pankreasprotease nicht von befriedi-gender Stabilität.

Aus den vorstehenden Angaben wird deutlich, daß pharmazeutische Zubereitungen, welche zur Totalsubstitution körpereigener Verdauungsenzyme von Säugetieren und Menschen vorge-

sehen sind, sorgfältig auf die körpereigenen Bedingungen abgestimmte Substitutionsenzyme bzw. Gemische von Substitutionsenzymen enthalten müssen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand daher darin, verbesserte Gemische von Verdauungsenzymen sowie solche Gemische enthaltende pharmazeutische Zubereitungen zur Behandlung und/oder Prophylaxe der Maladigestion bei Säugetieren und Menschen bereitzustellen, welche körpereigene lipolytische, proteolytische und amylolytische Enzymaktivitäten substituieren können und welche bei hoher spezifischer Aktivität der darin enthaltenen Substitutionsenzyme verhältnismäßig geringe Dosierungsmengen erlauben. Gleichzeitig sollten die in den Verdauungsenzymgemischen enthaltenen Substitutionsenzyme (Lipase, Protease, Amylase) sowohl einzeln, als auch im Gemisch miteinander alle Anforderungen, welche an zur Therapie beim Menschen vorgesehene Verdauungsenzyme gestellt werden, möglichst gut erfüllen. Beispielsweise sollten die Substitutionsenzyme eine gute pH-Stabilität und eine gute pH-Aktivität in dem an dem jeweiligen physiologischen Wirkort üblicherweise vorherrschenden pH-Bereich aufweisen. Ferner sollten die Substitutionsenzyme mit körpereigenen Wirkstoffen wie Gallensalzen oder körpereigenen Proteasen, beispielsweise Pepsin oder Pankreasproteasen, gut verträglich sein. Eine weitere Aufgabe bestand darin, für den erfindungsgemäßen Zweck solche Substitutionsenzyme auszuwählen, welche durch in bezug auf Verfahrensablauf und Produktmenge einfach standardisierbare Herstellungsverfahren in stets gleichbleibender Qualität und beliebiger Menge erhalten werden können.

Gelöst wird die Aufgabe durch die Bereitstellung eines neuen Gemisches mikrobieller Enzyme, welches

- a) eine konzentrierte Lipase von *Rhizopus delemar*,
- b) eine neutrale Protease von *Aspergillus melleus* und
- c) eine Amylase von *Aspergillus oryzae*

enthält. Erfindungsgemäße Gemische mikrobieller Enzyme können zusammen mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen in üblichen pharmazeutischen Zubereitungen enthalten sein. Diese pharmazeutischen Zubereitungen enthalten als Wirkstoffe ausschließlich erfindungsgemäße Gemische mikrobieller Enzyme von bestimmten Schimmelpilzen und sind zur Totalsubstitution körpereigener Verdauungsenzyme von Säugetieren und Menschen geeignet. Den in dem erfindungsgemäßen Gemisch mikrobieller Enzyme enthaltenen einzelnen Enzymen (Lipase, Protease, Amylase) ist gemeinsam, daß sie im physiologischen bis pathophysiologischen pH-Bereich des Verdauungstraktes (etwa pH 4 bis 8) und insbesondere unter den bei oder kurz nach der Nahrungsaufnahme vorherrschenden Bedingungen gute pH-Stabilität und gute pH-Aktivität aufweisen. Die pharmazeutischen Zubereitungen zeichnen sich darüber hinaus durch eine gute Wirksamkeit und gute Verträglichkeit aus.

Die konzentrierte Lipase von *Rhizopus delemar* hat eine spezifische Aktivität von mindestens 1.800.000 FIP-E/g (= international standardisierte Enzym-Aktivitätseinheiten nach den Vorschriften der "Féderation International Pharmaceutique", Belgien, bestimmt). Lipasen von Schimmelpilzen des Stammes *Rhizopus delemar* sind an sich bekannt und können z. B. nach an sich bekannten Verfahren aus Kulturbrühen des entsprechenden Pilzes erhalten werden. Anschließend können die isolierten Lipasen z. B. auf an sich bekannte Weise von Begleitstoffen befreit und angereichert bzw. konzentriert werden. Vorzugsweise kann die Lipase (EC-Nr. 3.1.1.3) "Lipase D Amano 2000®" von *Rhizopus delemar* der Firma Amano Pharmaceuticals, Japan, eingesetzt werden. Diese Lipase weist - wie die natürliche Pankreaslipase - eine 1,3-Positionsspezifität gegenüber Fettsäureglyceriden auf. Die spezifische Aktivität liegt in Abhängigkeit von der Charge zwischen etwa 1.800.000 FIP-E/g und etwa 2.250.000 FIP-E/g. "Lipase D Amano 2000®" zeichnet sich durch eine hohe Stabilität gegenüber Pankreasprotease aus Pankreatin aus. So liegt die lipolytische Aktivität von "Lipase D Amano 2000®" in einem Labor-

versuch nach zweistündiger Einwirkung von Pankreasprotease aus Pankreatin in einem pH-Bereich von pH 6 bis 8 noch bei 55 % der Ausgangsaktivität. Die pH-Stabilität der "Lipase D Amano 2000®" lag in einem Laborversuch in einem pH-Bereich von pH 4 bis 8 bei 37 °C über einen Zeitraum von 120 min. bei mindestens 70 % der Ausgangsaktivität.

Als charakteristische Bestimmungsgröße für eine konzentrierte Lipase von *Rhizopus delemar* ist beispielsweise deren pH-Profil geeignet. Es wurde daher das pH-Profil der "Lipase D Amano 2000®" als spezifische Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten bei den einzelnen pH-Werten wurden dabei nach einer Abwandlung der FIP-Methoden zur Bestimmung der Aktivität mikrobieller Lipasen gemessen. Zusätzlich wurden auch die pH-Profile in Gegenwart variabler Konzentrationen von Gallensalzen bestimmt.

a) Herstellung der Olivenölemulsion

44 g Gummi arabisch,
115 g Olivenöl und
400 ml Wasser

werden 15 min. lang im Elektromixer homogenisiert.

b) Herstellung der Galle-Dispert-Lösungen unterschiedlicher Konzentration

ohne Galle:	120 ml Wasser
0,5 mmol/l Galle:	120 ml Wasser + 200 mg Galle-Dispert (FIP-Standard)
5 mmol/l Galle:	120 ml Wasser + 2 g Galle-Dispert
10 mmol/l Galle:	120 ml Wasser + 4 g Galle-Dispert

c) Herstellung der Substratemuulsion

480 ml Olivenölemulsion (vide supra)
160 ml Calciumchloridlösung (28,3 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ /1 Wasser)
und
120 ml Galle-Dispert-Lösung (vide supra) der gewünschten
Konzentration

werden gemischt.

d) Herstellung der Enzymlösung

50 mg "Lipase D Amano 2000®" (spezifische Aktivität bestimmt zu 2.230.000 FIP-E/g) werden in 100 ml 1tiger Natriumchloridlösung gelöst. Von dieser Stammlösung wird 1 ml entnommen und mit Reinstwasser auf 200 ml verdünnt. Jeweils 1 ml der verdünnten Stammlösung (entsprechend 5,575 FIP-E) wird bei den folgenden Bestimmungen eingesetzt.

Von den vorstehend angegebenen Substratemuulsionen, in welchen bestimmte Gallensalzkonzentrationen vorliegen, werden jeweils Proben von 19 ml auf 37° C thermostatisiert. In verschiedenen Proben von Substratemuulsionen werden dann durch Zugabe von 0,1 M NaOH bzw. 1 M HCl pH-Werte von 3, 4, 5, 6, 7 und 8 eingestellt. Zu den so vorbereiteten Proben von Substratemuulsionen werden anschließend jeweils 1ml der vorstehend angegebenen Enzymlösung zugegeben (Anmerkung: um die optimale Titrationsrate zu bestimmen, kann die geeignete Menge von in der Enzymlösung idealerweise enthaltenen Lipase grundsätzlich auf an sich bekannte Weise durch eine Verdünnungsreihe ermittelt werden). Nach erfolgter Zugabe wird 10 min. lang eine pH-Stat-Titration mit 0,1 M NaOH durchgeführt. Danach wird innerhalb von 30 sec. eine Endpunktstiration bis auf pH 9 durchgeführt, um freigesetzte Fettsäuren vollständig zu dissoziieren. Der insgesamt benötigte Verbrauch an 0,1 M NaOH wird in Lipase-Aktivitätseinheiten E

umgerechnet: eine Lipase-Aktivitätseinheit E entspricht dabei einem Verbrauch von 1 μ Mol je Minute. Die ermittelten Lipase-Aktivitätseinheiten können durch Bezug auf die jeweils eingesetzte Menge an Trockenenzymen in g umgerechnet werden in Einheiten von E/mg. Zur Erstellung des pH-Profiles werden die Einheiten von E/mg für jeden untersuchten pH-Wert und jede untersuchte Gallensalzkonzentration in Tabelle 1 tabelliert und die tabellierten Werte werden in Fig. 1 graphisch aufgetragen.

Aus dem vorstehend angegebenen pH-Profil lässt sich das pH-Optimum für "Lipase D Amano 2000®" als Maximalwert der Lipaseaktivität bei der FIP-Standardgallensalzkonzentration von 0,5 mmol/l zu ca. pH 7 bestimmen.

Die neutrale Protease von *Aspergillus melleus* weist eine spezifische Aktivität von mindestens 7.500 FIP-E/g auf. Ihr pH-Optimum liegt zwischen pH 6 und pH 8. Neutrale Proteasen von Schimmelpilzen des Stammes *Aspergillus melleus* sind an sich bekannt und können z. B. nach an sich bekannten Verfahren aus Kulturbrühen des entsprechenden Pilzes erhalten werden. Anschließend können die isolierten Proteasen gewünschtenfalls auf an sich bekannte Weise von Begleitstoffen befreit und angereichert bzw. konzentriert werden.

Vorzugsweise kann die neutrale Protease "Prozyme 6®" von *Aspergillus melleus* der Firma Amano Pharmaceuticals, Japan, eingesetzt werden. Diese mikrobielle Protease weist eine spezifische Aktivität von etwa 7.800 FIP-E/g auf. Die pH-Stabilität der Protease "Prozyme 6®" in einem pH-Bereich von pH 5 bis 8 bei 37 °C lag über einem Zeitraum von 120 min. in einem Laborversuch bei mindestens 60 % der Ausgangsaktivität.

Als charakteristische Bestimmungsgröße für eine neutrale Protease von *Aspergillus melleus* ist beispielsweise deren pH-Profil geeignet. Es wurde daher das pH-Profil der Protease

"Prozyme 6®" als spezifische Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt.

Hierzu werden verschiedene Substratlösungen hergestellt, entsprechend den Vorschriften der FIP-Methode zur Aktivitätsbestimmung mikrobieller Proteasen. In Abwandlung der FIP-Vorschriften wird als Substratlösung eine 4 %ige Hämoglobinlösung anstelle von Casein verwendet. Zusätzlich werden in Abwandlung der FIP-Vorschriften in verschiedenen Substratlösungen durch Zugabe von entsprechenden Mengen 1M NaOH bzw. 1M HCl verschiedene pH-Werte von jeweils 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 eingestellt. Zu den Substratlösungen werden Proben von "Prozyme 6®" zugegeben.

Anschließend werden in den Substratlösungen unterschiedlicher pH-Werte die Proteaseaktivitäten der "Prozyme 6®"-Proben entsprechend den vorstehend genannten Vorschriften der FIP bestimmt. Die in den einzelnen Proben gefundenen Enzymaktivitäten werden auf den in dieser Meßreihe gefundenen Maximalwert (= 100 %) normiert. Die für "Prozyme 6®" gefundenen Meßwerte für das pH-Profil sind in Tabelle 2 tabelliert und in Fig. 2 graphisch aufgetragen. "Prozyme 6®" ist somit im physiologischen pH-Bereich optimal wirksam.

Aus dem vorstehend angegebenen pH-Profil lässt sich das pH-Optimum für "Prozyme 6®" als Maximalwert der Proteaseaktivität zu ca. pH 8 bestimmen.

Die erfindungsgemäß eingesetzte Amylase (EC-Nr. 3.2.1.1) von *Aspergillus oryzae* ist eine α -Amylase und weist eine spezifische Aktivität von mindestens 40.000 FIP-E/g (gemessen bei pH 5,8) auf. Das pH-Optimum liegt im pH-Bereich von pH 4 bis 6,5. Amylasen von Schimmelpilzen des Stammes *Aspergillus oryzae* sind an sich bekannt und können z. B. nach an sich bekannten Verfahren aus Kulturbrühen des entsprechenden Pilzes erhalten werden. Anschließend können die isolierten Amylasen gewünschtenfalls auf an sich bekannte Weise von Begleitstof-

fen befreit und angereichert bzw. konzentriert werden. Vorgezugsweise können die Amylasen "Amylase A1®" von Aspergillus melleus der Firma Amano Pharmaceuticals, Japan und "Amylase EC®" von Aspergillus melleus der Firma Extrakt-Chemie, Deutschland, eingesetzt werden. "Amylase A1®" ist bevorzugt.

Die mikrobielle Amylase "Amylase A1®" weist eine spezifische Aktivität von etwa 52.000 FIP-E/g (gemessen bei pH 5,8) auf. Die pH-Stabilität der "Amylase A1®" in einem pH-Bereich von pH 5 bis 8 bei 37 °C lag über einen Zeitraum von 120 min. in einem Laborversuch bei mindestens 85 % der Ausgangsaktivität. In weiteren Laborversuchen wurden gute Stabilitäten der "Amylase A1®" gegenüber Pankreasprotease aus Pankreatin (gemessen im pH-Bereich pH 6 bis 8), gegenüber "Prozyme 6®" (gemessen im pH-Bereich pH 4 bis 8) sowie gegenüber Pepsin festgestellt.

Als charakteristische Bestimmungsgröße für eine Amylase von Aspergillus oryzae ist beispielsweise deren pH-Profil geeignet. Es wurde daher das pH-Profil der "Amylase A1®" als spezifische Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt.

Es werden verschiedene Substratlösungen hergestellt, entsprechend den Vorschriften der FIP-Methode zur Aktivitätsbestimmung mikrobieller Amylasen. In Abwandlung der FIP-Vorschriften werden in verschiedenen Substratlösungen durch vorherige Zugabe entsprechender Mengen von 5 M NaOH bzw. 5 M HCl zu dem gemäß FIP-Methode verwendeten Acetatpuffer verschiedene pH-Werte von jeweils 3,25; 4; 5; 6; 6,8 und 7,4 eingesetzt. Zu den Substratlösungen werden Proben von "Amylase A1®" zugegeben.

Anschließend werden in Substratlösungen unterschiedlicher pH-Werte die Amylaseaktivitäten der "Amylase A1®"-Proben entsprechend den vorstehend genannten Vorschriften der FIP bestimmt. Die in den einzelnen Proben gefundenen Enzymaktivitäten werden auf den in dieser Meßreihe gefundenen Maxi-

malwert (= 100 %) normiert. Die für "Amylase A1®" gefundenen Meßwerte für das pH-Profil sind in Tabelle 3 tabelliert und in Fig. 3 graphisch aufgetragen.

Aus dem vorstehend angegebenen pH-Profil lässt sich das pH-Optimum für "Amylase A1®" als Maximalwert der Amylaseaktivität zu ca. pH 5 bestimmen.

Die mikrobielle Amylase "Amylase EC®" weist eine spezifische Aktivität von etwa 42.500 FIP-E/g (gemessen bei pH 5,8) auf. Daneben sind noch geringe Anteile von β -Amylase nachweisbar. Das pH-Optimum (gemessen nach der vorstehend für Amylase A1® angegebenen Methode) liegt bei etwa pH 5. Die pH-Stabilität der "Amylase EC®" in einem pH-Bereich von pH 6 bis 8 bei 37 °C lag über einem Zeitraum von 120 min. in einem Laborversuch bei mindestens 80 % der Ausgangsaktivität. In weiteren Laborversuchen wurden gute Stabilitäten der "Amylase EC®" gegenüber Pankreasprotease aus Pankreatin (gemessen im pH-Bereich pH 6 bis 8), gegenüber "Prozyme 6®" (gemessen im pH-Bereich pH 4 bis 8) sowie gegenüber Pepsin festgestellt.

Für die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen können vorzugsweise oral applizierbare Dosierungsformen gewählt werden, beispielsweise Pulver, Pellets oder Microspheres, welche gewünschtenfalls in Kapseln oder Sachets abgefüllt oder zu Tabletten verpreßt werden können oder auch flüssige pharmazeutische Zubereitungen wie Suspensionen oder Lösungen. Die einzelnen Enzyme Lipase, Protease und Amylase, können dabei gemeinsam oder räumlich voneinander getrennt vorliegen. Sofern die einzelnen Enzyme nicht räumlich voneinander getrennt vorliegen, ist eine trockene Verarbeitung und/oder Lagerung bevorzugt. Die pharmazeutischen Zubereitungen können weiterhin übliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthalten. Als Hilfs- und/oder Trägerstoffe kommen beispielsweise mikrokristalline Cellulosen, Polyethylenglykole, beispielsweise PEG 4000, oder auch niedere Alkohole, insbeson-

dere geradkettige oder verzweigte C₁-C₄-Alkohole wie 2-Propanol, sowie Wasser in Frage.

Die erfindungsgemäß eingesetzten mikrobiellen Substitutionsenzyme zeichnen sich durch eine gute Stabilität über weite pH-Bereiche aus und können daher ohne weitere Behandlung (wie Befilmung) direkt für die Herstellung oral zu applizierender pharmazeutischer Zubereitungen eingesetzt werden. Zu diesem Zweck können die einzelnen Substitutionsenzyme (Lipase, Protease und Amylase) gemeinsam oder räumlich voneinander getrennt pelletiert werden. Zur weiteren Erhöhung der pH-Stabilität kann es vorteilhaft sein, die einzelnen Substitutionsenzyme mit einer geeigneten, an sich bekannten magensaftresistenten Schicht zu befilmen. Sofern nicht alle Substitutionsenzyme magensaftresistent befilmt werden sollen, ist es zweckmäßig, die einzelnen Sorten von Substitutionsenzymen voneinander getrennt zu pelletieren und die Pellets einer Enzymsorte jeweils getrennt zu befilmen. Insbesondere kann es zweckmäßig sein, die Protease und/oder die Lipase jeweils einzeln zu pelletieren und magensaftresistent zu befilmen. Gewünschtenfalls können auch alle drei im Enzymgemisch vorliegenden Enzyme gemeinsam magensaftresistent befilmt werden oder es können zwei Enzyme magensaftresistent befilmt werden, während ein Enzym nicht befilmt wird.

Die hohen spezifischen Aktivitäten der erfindungsgemäß eingesetzten Substitutionsenzyme erlauben es, verhältnismäßig kleine Dosierungsformen mit dennoch hoher Wirksamkeit zur Verfügung zu stellen. Beispielsweise kann in einer Ausführungsform die pharmazeutische Zubereitung als oral applizierbare Kapsel der Größe 0 vorliegen. Auch in einer solchen Dosierungsform können etwa 10.000-50.000 FIP-E Lipase, 8.000 FIP-E Amylase und 200 FIP-E Protease vorliegen. Zweckmäßigerweise liegen die Substitutionsenzyme Lipase, Amylase und Protease in einem Verhältnis von ca. 50-500 FIP-E:40-120 FIP-E:1 FIP-E vor.

Die Eignung erfundungsgemäßer pharmazeutischer Zubereitungen zur Behandlung und/oder Prophylaxe der Maldigestion in Säugetieren und Menschen kann mit dem nachfolgend angegebenen in-vitro-Testmodell zur Bestimmung der Fettverdauung belegt werden:

1. Nachweis der Fettverdauung in einer Schweinefuttertestnahrung

Es wird der Einfluß eines Gemisches erfundungsgemäß einsetzbarer mikrobieller Enzyme auf den Fettabbau in einer auch andere Nahrungsbestandteile enthaltenden Schweinefutter-Testnahrung untersucht. Der Zusatz einer Calciumchlorid-Lösung dient dabei der Ausfällung freigewordener Fettsäuren als Calciumseifen.

A) Herstellung der Schweinefuttertestnahrung

Die nachfolgend angegebenen Bestandteile:

64,8 g "Altromin 9021®"-Fertignahrung (Fa. Altromin GmbH, Deutschland, Fettgehalt ca. 2 - 3 %, im wesentlichen bestehend aus geschrötem Weizen)
3,85 g "Sojamin®"-Proteingemisch (Fa. Lukas Meyer, Deutschland)
24,5 g Gummi Arabisch (Fa. Merck KGaA, Deutschland)
26,7 g Sojaöl (Fa. Roth, Deutschland; Haupt-Fettbestandteil; mittleres Molekulargewicht = 932 g/mol)

wurden mit 265 ml Reinstwasser vermischt und anschließend 15 min. lang im Haushaltsmixer homogenisiert. Das erhaltene Homogenisat wurde mit Reinstwasser bis auf ein Volumen von 450 ml aufgefüllt.

B) Herstellung der Galle-Dispert-Lösung

1,35 g Galle-Dispert (FIP-Standard; Lipase activation mixture) wurden in 50 ml Reinstwasser gelöst.

C) Herstellung der Enzymlösungen

1. Lipaselösung

63,1 mg "Lipase D Amano 2000®" der Fa. Amano Pharmaceuticals, Japan (spezifische Aktivität bei pH 7 bestimmt zu 1.888.137 FIP-E/g) wurden in 10 ml Reinstwasser gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 250 µl für die nachfolgende Messung eingesetzt.

2. Proteaselösung

319 mg "Prozyme 6®" der Fa. Amano Pharmaceuticals, Japan (spezifische Aktivität bei pH 7,5 bestimmt zu 7.812 FIP-E/g) wurden in 10 ml Reinstwasser gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 250 µl für die nachfolgende Messung eingesetzt.

3. Amylaselösung

595 mg "Amylase EC®" der Fa. Extrakt-Chemie, Deutschland (spezifische Aktivität bei pH 5,8 bestimmt zu 13.466 FIP-E/g) wurden in 10 ml Reinstwasser gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 1.000 µl für die nachfolgende Messung eingesetzt.

D) Vorbereitung der Meßlösung

15,5 ml der vorgenannten Schweinefutter-Testnahrung wurden mit 2 ml der vorgenannten Galle-Dispert-Lösung sowie nacheinander mit den drei vorgenannten Enzymlösungen C) 1.

bis C)3. versetzt und mit Reinstwasser auf 29 ml aufgefüllt.

E) Durchführung der Messung

Die vorbereitete Meßlösung wurde auf 37 °C temperiert und durch Endpunkt titration mit 1 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Unmittelbar nach Zugabe der drei Enzymlösungen wurde eine pH-Stat-Titration für 20 min. gestartet und der Verbrauch an 1 M NaOH wurde alle 10 sec. registriert. Während der Titration wurde 1 ml einer 4 M Calciumchloridlösung in Schritten von 50 µl manuell so zudosiert, daß eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wurde.

F) Ergebnis

Die in der Schweinefutter-Testnahrung enthaltenen Fette (= Fettsäuretriglyceride) waren nach 20 min. Reaktionszeit zu ca. 67 % hydrolysiert worden. Dies entspricht einem über 100%igen Abbau zu den physiologischen Hydrolyseprodukten, den 2-Fettsäuremonoglyceriden (Werte über 100 % sind auf spontane Umlagerung der 2-Fettsäuremonoglyceride zu 1- bzw. 3-Fettsäuremonoglyceriden und nachfolgende lipolytische Spaltung zurückzuführen).

Die gute Fettverdauungsleistung eines die erfindungsgemäß einsetzbaren Enzyme enthaltenden Verdauungsenzymgemisches kann auch *in vitro* an einer Olivenöl-Testnahrung belegt werden.

Die besonders gute Eignung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung und/oder Prophylaxe der Maldigestion in Säugetieren und Menschen, insbesondere der auf Pankreasinsuffizienz beruhenden Maldigestion, kann auch anhand von *in-vivo*-Tiermodellen, beispielsweise an pankreasinsuffizienten Schweinen, belegt werden:

2. Wirksamkeit eines erfindungsgemäßen Enzymgemisches am pankreasinsuffizienten Schwein in vivo

Die Versuche wurden an neun adulten weiblichen Göttingen Miniaturschweinen der Linie Ellegaard (33-40 kg Körpergewicht) durchgeführt, welchen jeweils eine ileocaecale Umleitungskanüle eingesetzt worden war. Die Umleitungskanüle diente zur Sammlung des Chymus der Versuchstiere. Sechs dieser Tiere wurde darüber hinaus der Pankreasgang ligiert (= Testtiere). Die übrigen drei Tiere behielten einen intakten Pankreasgang und dienten der Kontrolle der Versuchsergebnisse (= Kontrolltiere). Der Test wurde mit insgesamt drei verschiedenen Dosierungen eines erfindungsgemäßen Enzymgemisches durchgeführt. Es wurden die folgenden Enzymdosierungen verabreicht:

Dosis 1: 111.833 FIP-E/Mahlzeit "Lipase D Amano 2000®"
1.775 FIP-E/Mahlzeit "Prozyme 6®"
89.760 FIP-E/Mahlzeit "Amylase Al®"

Dosis 2: 223.665 FIP-E/Mahlzeit "Lipase D Amano 2000®"
3.551 FIP-E/Mahlzeit "Prozyme 6®"
179.520 FIP-E/Mahlzeit "Amylase Al®"

Dosis 3: 335.498 FIP-E/Mahlzeit "Lipase D Amano 2000®"
5.326 FIP-E/Mahlzeit "Prozyme 6®"
269.280 FIP-E/Mahlzeit "Amylase Al®"

Je Dosis wurden alle Tiere über einen Zeitraum von 22 Tagen täglich zweimal mit je 250 g eines fettreichen Versuchsfutters gefüttert, welches 170 g Haltungsfutter für Miniaturschweine (Altromin®, Fa. Lukas Meyer; im wesentlichen doppelt geschröterteter Weizen), 10 g Eiweißkonzentrat (Sojamine 90®, Fa. Lukas Meyer), 70 g Sojaöl (Fa. Roth) und 0,625 g Cr₂O₃ (als nicht-resorbierbarer Marker, Fa. Roth), vermischt mit 1 l Wasser, enthielt. Dem Futter nur der Testtiere wurden zu-

sätzlich die einzelnen Enzyme des erfundungsgemäßen Enzymgemisches in der entsprechenden Menge kurz vor der Fütterung zugemischt. Zusätzlich wurde mit fünf der Testtiere eine Testreihe durchgeführt, worin deren Versuchsfutter kein Enzymgemisch beigefügt wurde. Die bei dieser Testreihe ermittelten Ergebnisse werden nachfolgend als "Nullwerte" angegeben. Jeweils am 20. bis 22. Tag des Untersuchungszeitraumes wurden den Versuchstieren über 12 Stunden Chymusproben aus der Umleitungskanüle entnommen und diese wurden auf Ihren Gehalt an Rohfett, Rohprotein und Stärke untersucht. Die Fütterungsversuche und deren Auswertung wurden auf an sich bekannte Weise durchgeführt (vgl. P.C. Gregory, R. Tabeling, J. Kamphues, "Biology of the Pancreas in Growing Animals"; Developments in Animal and Veterinary Sciences 28 (1999) 381-394, Elsevier, Amsterdam; Hrsg.: S.G. Pierzynowski und R. Zabielski).

Die bei dem vorgenannten in-vivo-Versuch ermittelte scheinbare präcaecale Verdaulichkeit von Rohfett, Rohprotein und Stärke in den Versuchstieren wird in der nachfolgenden Tabelle A jeweils in Prozentwerten, bezogen auf die ursprünglich gefütterte absolute Menge an Fett, Protein bzw. Stärke angegeben. Die als "präcaecale Verdaulichkeit" angegebenen Werte entsprechen der "scheinbaren präcaecalen Verdaulichkeit", welche sich von der tatsächlichen präcaecalen Verdaulichkeit dadurch unterscheiden, daß sie auch noch geringe Mengen an endogenen Anteilen der untersuchten Stoffe, beispielsweise endogene Proteine, beinhalten können. Die präcaecalen Verdaulichkeiten wurden mit Hilfe der nachfolgend angegebenen Formel aus dem Chymus der Versuchstiere nach der Marker-Methode bestimmt:

präcaecale Verdaulichkeit SV

$$SV(\%) = 100 - \left(\frac{\% \text{ Indikator im Futter}}{\% \text{ Indikator im Chymus}} \times \frac{\% \text{ Nährstoff im Chymus}}{\% \text{ Nährstoff im Futter}} \times 100 \right)$$

Tabelle A:

Bestimmung der präcaecalen Verdauulichkeiten von Rohfett, Rohprotein und Stärke in den Versuchstieren in vivo

	Präcaecale Verdauulichkeit (%)		
	Rohfett	Rohprotein	Stärke
Nullwerte	29,0 +/- 9,8	33,7 +/- 5,2	63,8 +/- 6,7
Testtiere - Dosis 1	43,5 +/- 9,9	56,3 +/- 4,5	71,9 +/- 9,3
Testtiere - Dosis 2	52,1 +/- 8,3	64,0 +/- 3,7	74,2 +/- 5,8
Testtiere - Dosis 3	55,3 +/- 8,0	68,7 +/- 3,3	81,6 +/- 3,7
Kontrolltiere	97,6 +/- 0,02	82,3 +/- 1,5	96,9 +/- 0,5

Alle Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben.

Aus den angegebenen Versuchsergebnissen wird deutlich, daß durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Enzymgemisches eine signifikante Verbesserung der Verdauulichkeit von Fetten, Eiweißen und Kohlenhydraten beim pankreasinsuffizienten Schwein erzielt wird und daß diese Verbesserung dosisabhängig ist.

Beispiel II:

Aus 400 g "Lipase D Amano 2000®", 400 g PEG 4000 und 1.200 g Vivapur® (= mikrokristalline Cellulose) wurden unter Zusatz von wenig 2-Propanol und Wasser auf an sich bekannte Weise Pellets von 0,7 - 1,4 mm Durchmesser hergestellt.

Aus 7.000 g "Amylase A1®", 2.000 g PEG 4000 und 1.000 g "Vivapur®" wurden unter Zusatz von wenig 2-Propanol und Wasser auf an sich bekannte Weise Pellets von 0,7 - 1,7 mm Durchmesser hergestellt.

Aus 1.750 g "Prozyme 6®", 500 g PEG 4000 und 250 g "Vivapur®" wurden unter Zusatz von wenig 2-Propanol und Wasser auf an

sich bekannte Weise Pellets von 0,7 - 1,7 mm Durchmesser hergestellt.

Von den vorstehend hergestellten Pellets wurden jeweils 32 mg Lipase-Pellets, 325 mg Amylase-Pellets und 40 mg Protease-Pellets in eine Gelatine-Kapsel der Größe 0 abgefüllt. Man erhielt eine Dosierungsform mit folgenden Aktivitäten pro Kapsel:

Lipase ca. 10.000 FIP-E
Protease ca. 200 FIP-E
Amylase ca. 8.000 FIP-E

pH-Profil mikrobieller "Lipase D Amano 2000[®]"Tabell 1: pH-Profil v. "Lipas D Aman 2000[®]" in E/mg

pH	ohne Galle	0,5 mmol/l Galle	5 mmol/l Galle	10 mmol/l Galle
3	608	416	500	300
4	936	972	1076	480
5	1432	1342	960	1076
6	1048	1570	1382	1220
7	1024	2092	1832	988
8	308	732	1104	64
9	0	0	200	0

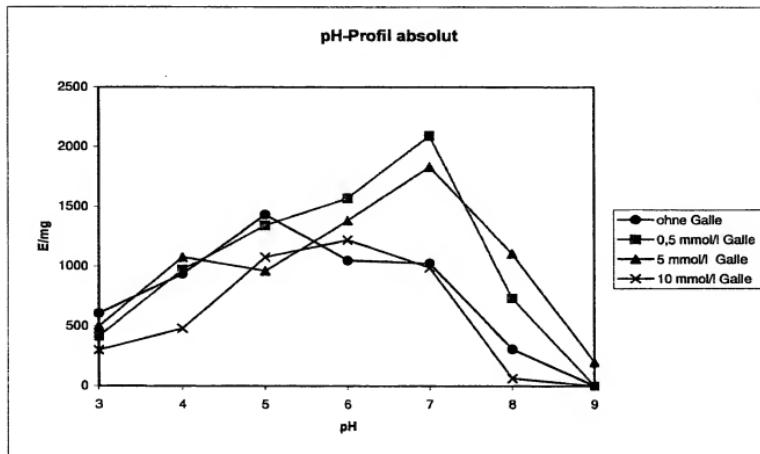


Fig. 1

pH-Profil mikrobieller Protease "Prozyme 6"

Standardaktivität pH 7,5: 7812 FIP/Eg

Proteasebestimmung nach FIP modifiziert, mit Hämoglobin als Substrat

Tabelle 2: Profil von "Prozyme 6" in % vom pH-Optimum (100%)

pH	%
2	1
3	0
4	63
5	67
6	77
7	77
8	100

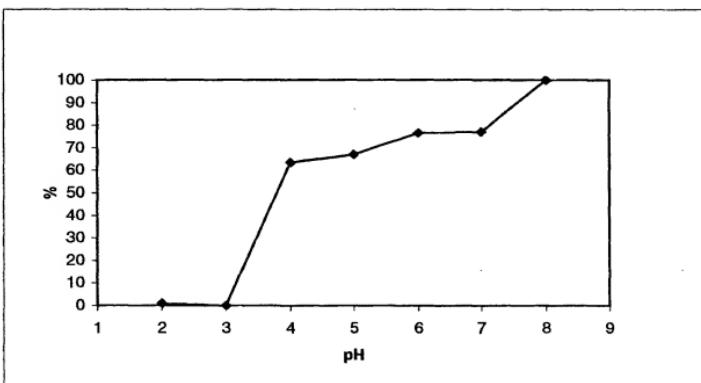


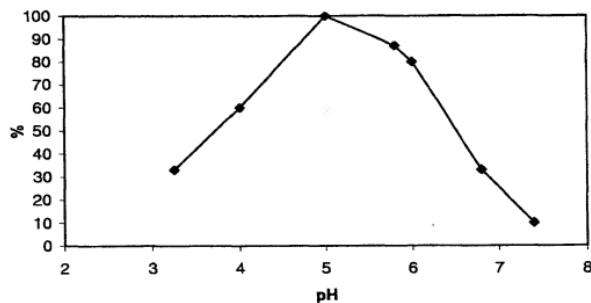
Fig. 2

pH-Profil mikrobieller "Amylase A1®"

Standardaktivität pH 5,8: 51870 FIP/Eg

Tabelle 3: pH-Profil "Amylase A1®" in % vom pH-Optimum (100%)

pH	%
3,25	33
4	60
5	100
5,8	87
6	80
6,8	33
7,4	10

**Fig.3**